

DETEKSI SECARA SEROLOGI DAN MOLEKULER BEBERAPA JENIS VIRUS YANG BERASOSIASI DENGAN PENYAKIT MOSAIK TANAMAN NILAM (*Pogostemon cablin* Benth)

*Serological and PCR Detection of Virus(es) Associated with Mosaic Symptoms on Patchouli Plant (*Pogostemon cablin* Benth)*

MIFTAKHUROHMAH¹⁾, GEDE SUASTIKA²⁾, dan TRI ASMIRA DAMAYANTI²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor 16111

²⁾Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jalan Kamper, Kampus Dramaga Bogor 16680

e-mail: miftah_tia05@yahoo.co.id

(Diterima Tgl. 28-2-2013 - Disetujui Tgl. 13-9-2013)

ABSTRAK

Penyakit mosaik pada tanaman nilam disebabkan oleh beberapa jenis virus, yaitu *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Cucumber mosaic virus* (CMV), dan *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara serologi dan molekuler virus-virus yang berasosiasi dengan gejala mosaik pada nilam di KP. Manoko, KP. Cicurug dan lahan petani di Cijeruk. Sampel daun nilam baik yang menunjukkan gejala mosaik atau pun tidak diambil dari setiap lokasi penanaman masing-masing sebanyak 30 sampel. Kejadian penyakit ditentukan melalui deteksi serologi dengan *Direct-ELISA* dan *Indirect-ELISA* terhadap sampel menggunakan empat antiserum, yaitu CMV, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Potyvirus*, dan BBWV2. Deteksi molekuler dengan RT-PCR dilakukan untuk mengonfirmasi virus baru yang ditemukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gejala infeksi virus yang ditemukan pada nilam bervariasi, yaitu mosaik lemah, mosaik kuning hijau, mosaik dengan penebalan, mosaik dengan malformasi daun, dan bintik kuning. Secara serologi, kejadian virus pada setiap kebun bervariasi. Di KP Manoko, *Potyvirus* dan BBWV2 lebih dominan (100%) dibandingkan CymMV. Di KP Cicurug, kejadian *Potyvirus* dan CMV terlihat lebih dominan (83,3 dan 80%) dibandingkan BBWV2 dan CymMV, sedangkan di Cijeruk, BBWV2 lebih dominan (90%) dari *Potyvirus* (50%) dan CMV (13,3%). Hasil RT-PCR dengan primer *degenerate* BBWV, diidentifikasi BBWV2 pada sampel daun nilam dari Manoko, Cicurug, dan Cijeruk, sedangkan dengan primer general *Potexvirus*, diidentifikasi CymMV hanya dari sampel daun nilam dari asal Manoko. Hasil penelitian ini merupakan laporan pertama tentang BBWV2 dan CymMV pada tanaman nilam di Jawa Barat yang mengindikasikan bahwa virus merupakan kendala utama pada perbenihan nilam yang harus segera diatasi.

Kata kunci: BBWV2, CymMV, mosaik, *Pogostemon cablin* Benth, PCR

ABSTRACT

Mosaic symptoms on patchouli plant are associated with several viruses, i.e. *Potyvirus*, *Potexvirus*, CMV, and BBWV2. The objective of the study was to detect virus(es) associated with mosaic symptoms on patchouli at the patchouli seed nurseries, in Manoko, Cicurug, and Cijeruk. Thirty leaf samples either showing typical symptomatic mosaic or asymptomatic were taken from each location. Serological testing by *Direct-ELISA* and *Indirect-ELISA* using four antisera namely CMV, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Potyvirus*, and BBWV2 was carried out to test the incidence of each virus. Molecular detection by RT-PCR was performed to confirm the new virus(es). The results showed that symptoms

of virus infection were found vary, i.e. weak mosaic, green yellow mosaic, mosaic with thickening, mosaic with leaf malformations, and yellow spot. Based on the serological detection, virus(es) incidence varied at each seed nurseries. In Manoko, *Potyvirus*, and BBWV2 were more dominant (100%) compared with CymMV. In Cicurug, *Potyvirus* and CMV were more dominant (83.3 and 80%) compared with BBWV2 and CymMV. While in Cijeruk, BBWV2 was the most dominant (90%) than *Potyvirus* (50%) and CMV (13.3%). Result of RT-PCR with *degenerate* primers pair of BBWV was successfully identified BBWV2 from Manoko, Cicurug, and Cijeruk samples, whereas by using *Potexvirus* general primary, CymMV was identified only from Manoko samples. BBWV2 and CymMV were first reported to infect patchouli in West Java. The result indicate that virus(es) are the major constraint on patchouli seed that should be managed immediately.

Key words: BBWV2, CymMV, mosaic, *Pogostemon cablin* Benth, PCR

PENDAHULUAN

Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) merupakan tanaman penghasil minyak atsiri yang menjadi salah satu sumber devisa Indonesia. Minyak nilam dalam dunia perdagangan internasional dikenal sebagai *patchouli oil*. Minyak nilam banyak digunakan sebagai bahan fiksatif dalam pembuatan parfum, sabun, dan kosmetik. Indonesia menyuplai kurang lebih 70% kebutuhan minyak nilam dunia dengan volume ekspor rata-rata di atas 1.000 ton per tahun dan hasil devisa rata-rata di atas 20 juta US \$ (BARANI, 2008). Hal ini mengakibatkan tingginya minat petani untuk mengembangkan tanaman nilam. Pada tahun 2009 luas areal penanaman nilam seluas 24.535 ha; meningkat sebesar 9,79% dari tahun sebelumnya. Namun, produktivitas nilam masih rendah, yaitu sebesar 0,11 ton/ha. Pada tahun 2010, terjadi penurunan luas penanaman sebesar 4,53% menjadi 23.472 ha, dan penurunan produktivitas sebesar 0,09 ton/ha (DIREKTORAT JENDERAL PERKEBUNAN, 2012).

Penurunan produktivitas nilam diduga karena adanya

serangan hama dan penyakit. Salah satu patogen penting pada tanaman nilam adalah virus. Beberapa virus yang dilaporkan menyerang tanaman nilam adalah *Patchouli mottle virus* (PatMoV) dan *Peanut stripe virus* (PStV) yang tergolong ke dalam genus *Potyvirus* (NATSUAKI *et al.*, 1994; SINGH *et al.*, 2009), *Patcouli mild mosaic virus* (PatMMV) yang tergolong ke dalam genus *Fabavirus* (NATSUAKI *et al.*, 1994), serta *Patchouli virus X* (PatVX), yang tergolong ke dalam genus *Potexvirus* (FILHO *et al.*, 2002). Pada pertanaman nilam di Jawa Tengah ditemukan PatMoV yang berasosiasi dengan gejala mosaik (SUMARDIYONO *et al.*, 1996), sedangkan di Cianjur dan Bogor gejala mosaik pada nilam berasosiasi dengan CMV dan *Potyvirus* (SUKAMTO *et al.*, 2007).

Penyakit mosaik diketahui telah menjadi kendala utama pada pertanaman nilam di Jawa dan Sumatera Barat. Kejadian penyakit mosaik akibat infeksi *Potyvirus* diperkirakan berkisar antara 30–50%, sedangkan di Jawa Tengah akibat infeksi *Broad bean wilt virus 2/BBWV2* (anggota genus *Fabavirus*) berkisar 40% (NOVERIZA *et al.*, 2012a). Penyakit mosaik menyebabkan penurunan bobot terna basah sebesar 7,87-34,65%, bobot terna kering sebesar 0,62-40,42% dan penurunan kadar *patchouli alcohol* sebesar 0,72-5,06% (NOVERIZA *et al.*, 2012b).

Usaha pengendalian virus pada tanaman harus dilakukan secara terpadu, di antaranya dengan memusnahkan/menghindarkan sumber inokulum, mengendalikan vektor, dan melindungi tanaman dari infeksi. Salah satu cara untuk menghindari dari sumber inokulum adalah dengan menggunakan bahan tanaman yang sehat, bebas dari infeksi virus. Penggunaan benih nilam bebas virus di samping efektif mengendalikan virus juga dapat meningkatkan biomassa (1,5-3,5 kali) dan hasil minyak atsiri (1,5-5,1 kali) dibandingkan dengan pertanaman nilam yang menggunakan bahan tanaman terinfeksi virus (SUGIMURA *et al.*, 1995). Untuk itu, upaya untuk memastikan benih nilam bebas dari virus sangatlah penting dan memerlukan metode diagnosis yang sensitif (MAKKOUK dan KUMARI, 2006).

Ada beberapa metode untuk mendeteksi virus, yaitu berdasarkan sifat-sifat biologi dan bagian dari partikel virus, yaitu asam nukleat. Deteksi berdasarkan asam nukleat dapat dilakukan secara serologi dan molekuler. Salah satu teknik serologi adalah *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), sedangkan teknik molekuler yang umum digunakan adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (NAIDU dan HUGHES, 2003).

Kebun benih nilam di Kebun Percobaan (KP) Manoko (Lembang), KP Cicurug (Sukabumi), dan kebun petani di Cijeruk (Bogor) cukup luas dan menjadi salah satu sumber benih utama. Hasil pengamatan awal di ketiga kebun benih tersebut ditemukan gejala penyakit mosaik yang diduga berasosiasi dengan virus. Keberadaan virus pada kebun benih nilam tersebut dikhawatirkan akan berdampak buruk pada pengembangan perbenihan nilam dan produksi minyak nilam.

Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi secara serologi dan molekuler virus yang berasosiasi dengan gejala mosaik pada tanaman nilam.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Virologi Institut Pertanian Bogor, dari Januari sampai Juli 2012. Sampel daun tanaman nilam diambil dari kebun benih nilam KP Cicurug, KP Manoko, dan lahan petani di Cijeruk, baik yang bergejala mosaik maupun tidak. Dari setiap lokasi diambil 30 sampel daun nilam muda, 5 di antaranya dari tanaman sehat dan sisanya dari tanaman bergejala mosaik. Pengambilan sampel daun dilakukan secara acak, baik pada tanaman yang sehat maupun yang sakit. Sampel daun dibungkus pelepah batang pisang kemudian dimasukkan ke dalam plastik untuk menjaga kesegarannya hingga tiba di laboratorium. Di laboratorium, daun ditimbang sebanyak 0,1 g untuk setiap sampel, dimasukkan ke plastik tebal kemudian disimpan di suhu -80°C sampai digunakan untuk deteksi serologi dan molekuler. Di lapang, dilakukan dokumentasi gejala untuk keperluan deskripsi gejala mosaik, yaitu lemah sampai parah, dan gejala penebalan daun ataupun daun mengecil, seperti diuraikan oleh NOVERIZA *et al.* (2012a).

Deteksi Serologi

Berdasarkan penelitian di dalam dan luar negeri, deteksi virus-virus yang ditemukan pada tanaman nilam, yaitu *Potyvirus*, *BBWV2*, *Potexvirus*, dan *CMV*, menggunakan antiserum universal *Potyvirus*, antiserum spesifik *BBWV2* dan *Cymbidium mosaic virus/CymMV* (DSMZ), serta antiserum spesifik *CMV* (Agdia). Antiserum general *Potexvirus* tidak tersedia, maka deteksi awal *Potexvirus* dilakukan secara molekuler. Setelah diketahui jenis virus yang menginfeksi adalah *CymMV* maka deteksi secara serologi dilakukan menggunakan antiserum *CymMV*.

Sampel daun nilam yang didapatkan dari setiap lokasi sebanyak 30 sampel dibuat menjadi 6 sampel komposit dan setiap komposit terdiri atas 5 sampel. Penggunaan sampel komposit bertujuan untuk meminimalkan sampel yang dideteksi dan penggunaan bahan-bahan ELISA, khususnya antiserum. Selanjutnya, apabila sampel komposit menunjukkan hasil positif maka uji serologi dilanjutkan terhadap setiap individu sampel dari sampel komposit positif tersebut.

Prosedur *direct-ELISA* *BBWV2* dan *CymMV* dan metode *indirect-ELISA* *Potyvirus* mengacu pada protokol yang dibuat oleh produsen antiserum DSMZ (Jerman), sedangkan *indirect-ELISA* *CMV* dilakukan sesuai protokol yang dibuat oleh Agdia (USA). Prosedur *direct-ELISA* tersebut mengikuti cara CLARK dan ADAMS (1977), sedangkan prosedur *indirect-ELISA* mengikuti cara KOENIG (1981).

Akumulasi virus secara kuantitatif dibaca dengan ELISA READER pada panjang gelombang 405 nm. Hasil pembacaan dinilai positif apabila nilai absorbannya 1,5-2 kali lebih besar daripada nilai absorbansi sampel dari tanaman sehat (MATTHEWS, 1993, dalam DAMAYANTI, 2004).

Deteksi Molekuler

Deteksi molekuler dilakukan terhadap BBWV2 dan CymMV. Deteksi dan identifikasi secara molekuler mengikuti prosedur NAIDU dan HUGHES (2003).

Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA total dilakukan dengan menggunakan *Xprep Plant RNA mini kit* dengan prosedur sesuai anjuran PKT-Philekorea Technology.

Konstruksi cDNA (complementary DNA)

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) dilakukan untuk membuat cDNA dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Adapun reaksi RT-PCR dilakukan dalam 10

µl reaksi campuran yang terdiri dari H₂O bebas nuklease (3,2 µl), bufer RT 10x (1 µl), DTT 50 mM (0,35 µl), dNTP 10 mM (2 µl), M MuLV Rew (Fermentas) (0,35 µl), RNase I (0,35 µl), Oligo d(T) 10 mM (0,75 µl), dan RNA template (2 µl) selama 1 jam pada suhu 42°C.

Amplifikasi DNA dengan PCR

Sepasang primer *degenerate* untuk BBWV1 dan BBWV2 (Tabel 1) digunakan dalam deteksi awal BBWV2 pada nilam. Dengan primer ini, ukuran produk yang didapatkan sebesar 323 bp, yang merupakan bagian dari C-terminal *Large Coat Protein* (LCP) sampai N-terminal *Short Coat Protein* (SCP) (KONDO *et al.*, 2005). Untuk mendeteksi *Potexvirus* pada nilam digunakan sepasang primer universal *Potexvirus*, yang mengamplifikasi bagian *RNA dependent RNA polymerase* (RdRp/replikase) (MIGLINO *et al.*, 2011) seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer-primer yang digunakan untuk deteksi virus-virus penyebab gejala mosaik pada tanaman nilam

Table 1. Primers used for detection virus(es) causes mosaic symptoms on patchouli plant

No. No.	Pasangan Primer Primer Base	Urutan Basa Base sequence	Ukuran DNA Size DNA	Referensi Reference
1	BBWVVSSP BBWVKMRM	5'-GTBTCDAGTGCTYTD GAAGG-3' 5'-TDGWDCCATCVAG ICKCATTTT-3'	323 pb	KONDO <i>et al.</i> , 2005
2	Potex4 Potex5	5'-AGCATGGCGCCATCTTGTGACTG-3' 5'-CTGAAGTCACAATGGGTGAAGAA-3'	280 pb	MIGLINO <i>et al.</i> , 2011

Tabel 2. Program PCR setiap primer yang digunakan untuk kegiatan PCR

Table 2. PCR programe for each primer used for PCR

No. No.	Pasangan Primer Primer Base	Program PCR PCR Programme	Referensi Reference
1	BBWVVSSP BBWVKMRM	95°C (5 menit); 35 siklus terdiri dari 95°C (1 menit), 51°C (1 menit), dan 72°C (1 menit); diakhiri 72°C (5 menit)	KONDO <i>et al.</i> , 2005
2	Potex4 Potex5	94°C (2 menit); 35 siklus terdiri dari 94°C (30 detik), 55°C (1 menit), dan 72°C (1 menit); diakhiri 72°C (5 menit)	MIGLINO <i>et al.</i> , 2011

cDNA yang dihasilkan dari hasil RT-PCR diamplifikasi dalam reaksi campuran dengan total volume 25 µl yang terdiri dari H₂O (9,5 µl), PCR mix 2x (Go Green Taq Master Mix, Promega) (12,5 µl), primer *forward* 10 mM (1 µl), primer *reverse* 10 mM (1 µl), dan cDNA (1 µl). Program PCR diatur sesuai dengan primer yang digunakan (Tabel 2). Kontrol positif primer Potex 4 dan Potex 5 digunakan CymMV dari anggrek.

Visualisasi DNA

Sampel DNA hasil amplifikasi PCR dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose 1,5 % + *ethidium bromida* (0,5

µl/10 ml 0,5x TBE) kemudian dielektroforesis pada 50 Volt selama 50 menit. Hasil visualisasi dilihat di bawah *transilluminator ultraviolet* dan didokumentasi dengan kamera digital.

Peruntan Susunan Nukleotida

Peruntan susunan nukleotida menggunakan mesin sequencer *ABI-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* di laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Genetika Science, Indonesia. Hasil sekuen dianalisis menggunakan *software* BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala Infeksi Virus pada Nilam

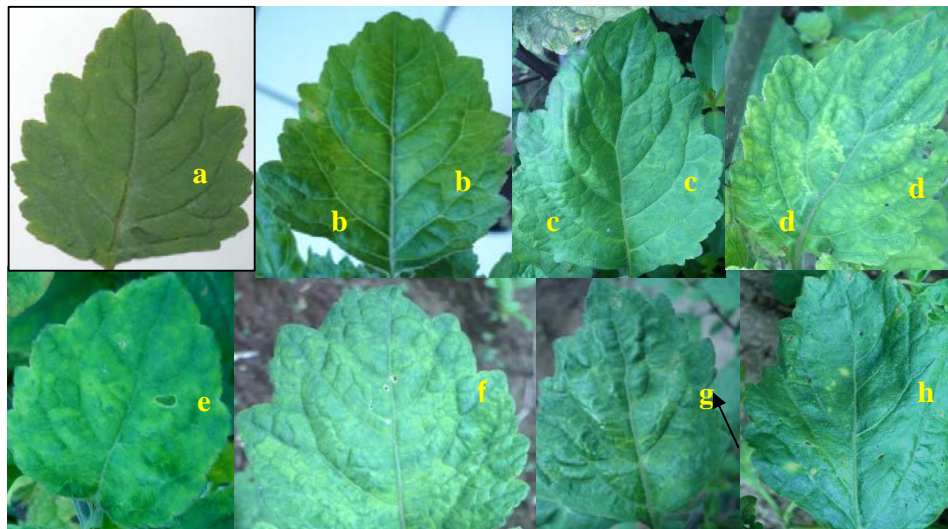
Infeksi virus pada pertanaman nilam di KP. Cicurug, KP. Manoko, dan lahan petani di Cijeruk menunjukkan beberapa variasi gejala mosaik, yaitu tidak bergejala, mosaik lemah, bintik kuning, mosaik hijau muda hijau tua, penebalan pada warna hijau tua yang menyebabkan daun terlihat bergelombang, mosaik dengan perubahan bentuk pada daun (*malformasi*), serta mosaik hijau tua dan kuning (Gambar 1). Beragam gejala mosaik tersebut ditemukan di semua lokasi pengambilan sampel, sedangkan gejala bintik kuning ditemukan pada tanaman nilam di KP. Cicurug. Berdasarkan pengamatan secara sekilas di lapang, keparahan penyakit mosaik berkisar 70-90%.

Gejala mosaik dapat didefinisikan sebagai terjadinya perubahan warna yang tidak merata pada daun. Perubahan warna terjadi karena serangan virus tidak merata ke seluruh sel-sel daun. Infeksi virus menyebabkan klorofil daun rusak sehingga warna daun berubah menjadi kuning atau hijau muda. Pada infeksi parah, gejala mosaik sering disertai dengan terjadinya perubahan bentuk dan permukaan daun, seperti daun mengecil dan bergelombang. Daun menjadi bergelombang karena bagian daun yang berwarna hijau muda atau kuning menipis dibandingkan yang berwarna hijau (yang normal). Pada bagian yang menipis inilah lebih

banyak mengandung virus. Akibatnya, sel-sel daun memendek (NURHAYATI, komunikasi pribadi).

Gejala awal mosaik lemah sulit dibedakan karena perubahan warna yang terjadi hanya terlihat samar-samar sehingga perlu pengamatan secara seksama. Gejala mosaik lemah diduga merupakan awal infeksi virus. Gejala infeksi PatMoV (*Potyvirus*) pada pertanaman nilam di Jepang menyebabkan gejala belang lemah, sedangkan infeksi PatMMV menyebabkan gejala mosaik lemah. Gejala yang lebih parah pada tanaman nilam akan terjadi apabila tanaman terinfeksi ganda beragam jenis virus seperti PatMoV dan PatMMV (NATSUAKI *et al.*, 1994). Infeksi PSTV (*Potyvirus*) pada pertanaman nilam di India menyebabkan gejala mosaik yang khas pada daun nilam (SINGH *et al.*, 2009).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa gejala mosaik pada tanaman nilam di Bogor, Cianjur, Sukabumi, dan Garut (Jawa Barat), Pakpak Barat (Sumatera Utara), dan Pasaman Barat (Sumatera Barat) disebabkan oleh *Potyvirus* secara tunggal, sedangkan gejala mosaik yang ditemukan di Brebes (Jawa Tengah) disebabkan oleh infeksi tunggal BBWV2 (NOVERIZA *et al.*, 2012a). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gejala mosaik bisa disebabkan oleh dua macam virus. Dengan demikian, deteksi virus tidak bisa dilakukan hanya berdasarkan gejala saja, tetapi harus dilanjutkan dengan deteksi lebih lanjut, baik dengan teknik serologi maupun molekuler.



Gambar 5. Gejala infeksi virus di lapangan. a. tidak bergejala; b dan c. mosaik lemah; d-g. variasi gejala mosaik; h. bintik kuning

Figure 5. Symptoms of viral infection on the leaves of patchouli. a. asymptomatic; b and c. weak mosaic; d-g. variations of mosaic symptom; h. yellow spots

Berdasarkan hasil deteksi secara serologi, gejala mosaik dapat disebabkan oleh infeksi 2-4 virus. Oleh karena itu, identifikasi jenis virus tidak bisa dilakukan berdasarkan deskripsi gejala saja.

Untuk mendapatkan gejala yang khas dari setiap infeksi virus, maka perlu dilakukan pemurnian virus pada tanaman indikator virus kemudian dilakukan inokulasi ke tanaman nilam yang sehat dan diamati karakteristik

gejalanya. Dalam penelitian ini tidak dilakukan pengamatan gejala infeksi virus secara individu, namun hanya dilakukan pengamatan tanaman bergejala mosaik dan deteksi virus yang berasosiasi dengan gejala yang ditemukan di lapang.

Kejadian Penyakit Virus pada Pertanaman Nilam

Potyvirus lebih dominan pada tanaman nilam di KP. Manoko dan Cicurug, BBWV2 di Cijeruk dan KP Manoko, serta CMV di KP Cicurug. CymMV hanya ditemukan di Manoko dan di Cicurug dengan tingkat kejadian rendah, yaitu 3,33% (Tabel 3). Hasil ini menunjukkan bahwa penyebaran virus telah merata pada ketiga lokasi sumber benih nilam dengan kejadian yang tinggi. Hal ini diduga disebabkan oleh kondisi lingkungan yang mendukung (suhu, kelembaban, dan vektor) serta virus yang lebih virulen. Hasil serupa dilaporkan pada nilam varietas Lhokseumawe dan Tapak Tuan di kebun Unit Pelayanan Benih Sebar (UPBS) Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) yang terdeteksi *Potyvirus* secara serologi (NOVERIZA *et al.* 2012b). Hasil ini menunjukkan bahwa varietas-varietas tanaman nilam yang dimiliki oleh Balitro rentan terhadap infeksi virus. Selain ketahanan tanaman, infeksi virus di lapangan juga dipengaruhi oleh penyebaran virus. Keberadaan vektor di lapang paling

berperan dalam penyebaran virus karena selain membawa virus ke tanaman, juga menularkan virus dari tanaman sakit ke tanaman sehat (AGRIOS, 2005). *Aphis gossypii* sebagai salah satu hama pada tanaman nilam, berperan sebagai vektor *Potyvirus*, CMV, dan BBWV. Keberadaan vektor yang membawa tiga virus ini diduga merupakan penyebab meluasnya infeksi beberapa virus pada tanaman nilam.

Berdasarkan deteksi secara serologi, terlihat bahwa infeksi virus pada pertanaman nilam di ketiga lokasi mencapai 100%, lebih tinggi dari pengamatan berdasarkan gejala (70-90%). Hal ini terjadi karena pada tanaman yang tidak bergejala, juga terdeteksi terinfeksi oleh *Potyvirus*, CMV, BBWV2, dan CymMV, baik secara tunggal maupun campuran. Infeksi tanpa gejala pada tanaman nilam juga ditemukan di Brazil yang disebabkan oleh PatVX (*Potexvirus*) (FILHO *et al.*, 2002). Selain itu, PatMMV dan PatMoV terdeteksi juga pada tanaman nilam di Jepang yang tidak bergejala (NATSUAKI *et al.*, 1994).

Deteksi *Potexvirus* secara serologi telah dilakukan terhadap sampel nilam dari Cianjur dan Bogor, namun tidak ada sampel yang bereaksi positif (SUKAMTO *et al.*, 2007). Ditemukannya CymMV di KP. Manoko dan Cicurug merupakan laporan pertama infeksi CymMV pada tanaman nilam.

Tabel 3. Kejadian *Potyvirus*, BBWV2, CymMV, dan CMV berdasarkan deteksi serologi pada pertanaman nilam di KP. Manoko, Cicurug, dan Cijeruk.

Table 3. Disease incidence of *Potyvirus*, BBWV2, CymMV, and CMV based on serological test in patchouli cultivation in Manoko, Cicurug and Cijeruk research garden

Lokasi Location	Kejadian/30 sample (%) Incidence/30 of sample (%)			
	<i>Potyvirus</i>	BBWV2	CymMV	CMV
Manoko	100	100	3,33	0
Cicurug	83,33	73,33	3,33	80,00
Cijeruk	50,00	90,00	0	13,33

Deteksi *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2) dan *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) secara Molekuler

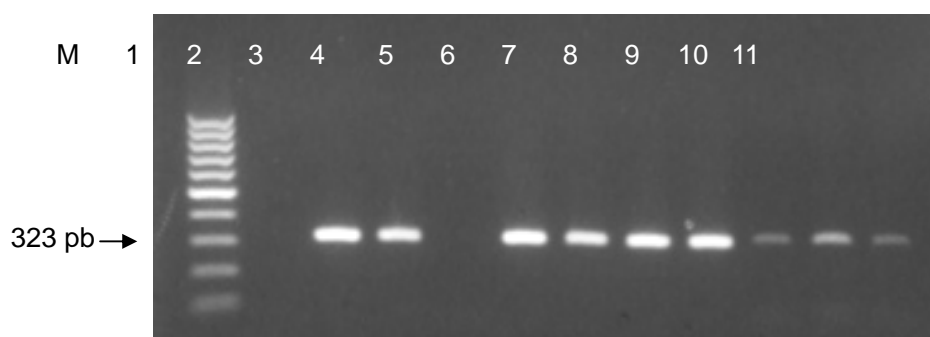
Broad bean wilt virus 2/BBWV2

Hasil deteksi secara RT-PCR dengan primer menunjukkan bahwa DNA BBWV2 berhasil diamplifikasi dan berukuran 323 pb (Gambar 2). Hasil BLAST terhadap sekuen nukleotida BBWV2 isolat asal Cicurug menunjukkan memiliki kemiripan sebesar 90% dengan isolat BBWV2 asal Singapura, dengan kode akses AF225954 (Tabel 4). Hasil ini menunjukkan bahwa isolat yang ditemukan adalah BBWV2.

BBWV1 dan BBWV2 merupakan tipe *Fabavirus* (MURPHY *et al.*, 1995 dalam YI-JUN *et al.*, 2000) yang memiliki kisaran inang luas, seperti basil (*Ocimum basilicum*) (SANTZ *et al.*, 2001), gentian (*Gentiana scabra*) (KOBAYASHI *et al.*, 2005), *Micania micrantha* (WANG *et*

al., 2008), gadung Cina (*Dioscorea opposita* Thunb.), dan cabai (*Capsicum annum*) (LEE *et al.*, 2000). *Broad bean wilt I* ditularkan secara efektif oleh *Myzus persicae* dan *A. gossypii* (BELLIORE *et al.*, 2009).

Anggota *Fabavirus* yang menyebabkan gejala mosaik pada tanaman nilam di Jepang adalah PatMMV. Virus ini memiliki kemiripan dengan BBWV, baik secara morfologi partikel, berat molekul CP, dan serologi. Namun demikian, PatMMV mempunyai kisaran inang yang berbeda sehingga PatMMV dikategorikan sebagai spesies baru anggota *Fabavirus* (NATSUAKI *et al.*, 1994). *Fabavirus* yang menginfeksi pertanaman nilam di Indonesia berdasarkan analisa BLAST merupakan BBWV2, bukan PatMMV. PatMMV akhir-akhir ini diklasifikasikan sebagai salah satu strain BBWV2 karena perbedaan gen CP-nya hanya berkisar antara 3-21% dengan BBWV2 (FAUQUET *et al.*, 2005).



Gambar 2. Hasil visualisasi RT-PCR dengan primer BBWVVSSP dan BBWVKMRM pada gel agarose 1,5 %: M. Marker 100 pb; 1. kontrol negatif; 2-3. isolat dari Manoko, positif; 4. isolat Manoko, negatif; 5-7. isolat dari Cicurug positif; 8-11. isolat dari Cijeruk positif

Figure 2. Visualization result of PCR with primers BBWVSSP and BBWVKMRM on 1.5 % agarose gel: M. Marker 100 bp (base pairs); 1. negative control; 2-3. Manoko isolates, positive; 4. Manoko isolates, negative; 5-7. Cicurug isolates, positive; 8-11. Cijeruk isolates, positive

Tabel 4. Hasil BLAST sekuen nukleotida isolat BBWV2 asal KP Cicurug

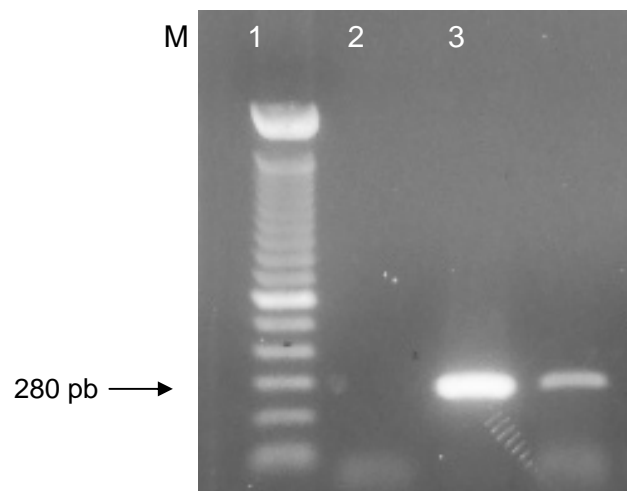
Table 4. The BLAST nucleotide sequence from BBWV2 Cicurug isolates

No No	Asal Isolat BBWV2 BBWV2 origin isolate	Inang Host	Homologi Homology (%)	Aksesi Accession
1	Singapura	<i>Megakepasma erythroclamys</i>	90	AF225954
2	Jepang	Cabai	88	AB018698
3	Korea Selatan	Cabai	88	JX183234
4	Cina	Lada	86	HQ283390
5	Korea Selatan	Kacang babi	85	AB161178
6	Taiwan	<i>Salvia dorisiana</i>	78	EF392660
7	Jepang	<i>Chinese yam</i>	78	AB207244
8	Jepang	<i>Gentiana triflora</i>	79	AB746939
9	Cina	<i>Bupleurum chinense</i>	79	FJ485685
10	Cina	Tomat	77	JQ855708

Cymbidium mosaic virus/CymMV

Hasil RT-PCR dengan primer universal *Potexvirus* menunjukkan bahwa *Potexvirus* ditemukan pada sampel nilam dari Manoko dengan tingkat kemiripan 95-98% dengan isolat CymMV asal anggrek dan vanili (Gambar 3 dan Tabel 5). CymMV merupakan virus penting pada tanaman anggrek di beberapa negara. Selain tanaman anggrek, CymMV juga dilaporkan menginfeksi tanaman panili (GRISONI *et al.*, 2004). Di Indonesia, CymMV

dilaporkan menginfeksi tanaman anggrek *Cymbidium*, *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, dan *Oncidium*, menyebabkan gejala mosaik dan nekrotik pada daun (LAKANI *et al.*, 2011). Namun demikian, infeksi CymMV pada tanaman nilam belum pernah dilaporkan. Dengan demikian, dengan ditemukannya CymMV di Manoko dan Cicurug, merupakan laporan pertama infeksi CymMV pada tanaman nilam.



Gambar 3. Hasil visualisasi PCR dengan primer general *Potexvirus* pada gel agarose 1,5%. M. marker 100 pb; 1. kontrol negatif; 2. kontrol positif, CymMV asal Anggrek; 3. isolat Manoko; 6. isolat Cicurug; 7. isolat Cijeruk

Figure 3. The visualization result of PCR with general primers of *Potexvirus* on 1.5% agarose gel. M. 100 bp marker; 1. negative control; 2. Positive control, CymMV on orchid; 3. Manoko isolates, positive; 6. Cicurug isolate; 7. Cijeruk isolate

Tabel 5. Hasil BLAST sekuen nukleotida isolat CymMV asal KP Manoko

Table 5. The BLAST result of nucleotide sequence from CymMV Manoko isolates

No No	Asal Isolat CymMV CymMV isolate origin	Inang Host	Homologi (%) Homology (%)	Akresi Accession
1	Hawai	<i>Dendrobium</i>	98	EF125180
2	Cina	<i>Phalaenopsis</i>	97	JQ860108
3	India	<i>Phaius tancarvilleae</i>	96	AJ849639
4	Meksiko	<i>Encyclia</i> sp.	96	HQ393960
5	Jepang	<i>Cymbidium</i>	96	AB197937
6	Taiwan	<i>Phalaenopsis</i>	95	EU314803
7	Perancis	Vanili	95	AM236040
8	Cina	Vanili	95	HQ681906
9	Singapura	<i>Cattleya</i>	95	U62963

KESIMPULAN DAN SARAN

Gejala mosaik pada tanaman nilam di tiga kebun benih (KP Manoko, KP Cicurug, dan kebun Cijeruk) bervariasi, yaitu mosaik lemah, bintik kuning, mosaik hijau muda hijau tua, mosaik kuning bergelombang, mosaik dengan perubahan bentuk pada daun (*malformasi*), dan mosaik hijau tua kuning. Berdasarkan deteksi serologi, gejala mosaik diakibatkan oleh infeksi tunggal maupun campuran beberapa jenis virus seperti *Potyvirus*, BBWV2, CymMV, dan CMV. Konfirmasi hasil deteksi serologi secara molekuler menggunakan primer *degenerate* BBWV dan primer *universal Potexvirus* positif BBWV2 dan CymMV. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa isolat *Potexvirus* asal KP. Manoko yang ditemukan memiliki kemiripan sebesar 98% dengan isolat CymMV dari

beberapa negara, sedangkan BBWV2 asal KP. Cicurug memiliki kemiripan sebesar 90% dengan BBWV2 asal Singapura. Kegiatan penelitian ini perlu dilanjutkan dengan penelitian ekobiologi setiap virus dan identifikasi secara molekuler virus-virus baru yang ditemukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Litbang Pertanian yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan studi Pascasarjana di IPB dan biaya yang diberikan untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AGRIOS N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. New York (US) : Elsevier Academic Press. hlm 743.
- ALTSCHUL, S.F., W. GISH, W. MILLER, E.W. MYERS, D.J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215 : 403-410.
- BARANI, A.M. 2008. Strategi pengembangan nilam di Indonesia. Prosiding Seminar Nasional Pengendalian Terpadu Organisme Pengganggu Tanaman Jahe dan Nilam. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. hlm 7-14.
- BELLIURE, B., M.G. ZAMBRANO, I. FERRIOL, M. LA SPINA, L. ALCACER, D.E. DEBRECZENI, and L. RUBIO. 2009. Comparative transmission efficiency of two *Broad bean wilt virus 1* isolates by *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. Short Communication. Journal of Plant Pathology. 91(2): 475-478.
- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology. 34: 475-483.
- DAMAYANTI. 2004. Pencirian Gen Protein Selubung *Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus* pada Tanaman Kabocha (*Cucurbita maxima* Duch.) dengan Analisis Restriksi. Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian. IPB. Hlm. 20.
- DIREKTORAT JENDERAL PERKEBUNAN. 2012. Statistik Perkebunan Indonesia. Tree Crop Estate Statistics of Indonesia. 2010-2012. Tanaman Semusim (Seasonal Crop): Akar Wangi (Vetiver), Jarak Kepyar (Castor Bean), Nilam (Patchouli), Tanaman Penghasil Serat (Producing Fiber Crop), Sereh Wangi (Citronella). Jakarta (ID): Direktorat Jenderal Perkebunan. hlm 35-54.
- FAUQUET, C.M., M.A. MAYO, J. MANILOFF, U. DESSELBERGER, and L.A. BALL. 2005. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. New York (US): Elsevier Academic Press. hlm 812-1095.
- FILHO, P.E.M., R.O. RESENDE, M.I. LIMA, and E.W. KITAJIWA. 2002. *Patchouli virus* X, a new *Potexvirus* from *Pogostemon cablin*. Annals of Applied. Biology. 141: 267-274.
- GRISONI, M., F. DAVIDSON, C. HYDRONDELLE, K. FARREYROL, M.L. CARUANA, and M. PERASON. 2004. Nature, incidence, and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. Plant Disease. 88: 119-124.
- KOBAYASHI, Y.O., A. KOBAYASHI, K. HAGIWARA, H. UGA, Y. MIKOSHIBA, T. NAITO, Y. HONDA, and T. OMURA. 2005. *Gentian mosaic virus*: a new species in the genus *Fabavirus*. Phytopathology. 95: 192-197.
- KOENIG, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 55: 53-62. <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract /55/1/53>. [diunduh Tgl 22 April 2011].
- KONDO, T., S. FUJI, K. YAMASHITA, D.K. KANG, dan M.U. CHANG. 2005. *Broad bean wilt virus 2* in Yams. Journal of General Plant Pathology. 71: 441-443.
- LAKANI, I., G. SUASTIKA, T.A. DAMAYANTI, and N. MATTJIK. 2011. Molecular characterization of *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) infecting orchid in Java, Indonesia. An Abstract. Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. 17(1): 227-273.
- LEE, U., J.S. HONG, J.K. CHOI, K.C. KIM, Y.S. KIM, I.S. CURTIS, H.G. NAM, and P.O. LIM. 2000. *Broad bean wilt virus* causes necrotic symptoms and generates defective RNAs in *Capsicum annuum*. Phytopathology. 90: 1390-1395.
- MAKKOUK, K. and S. KUMARI. 2006. Molecular diagnosis of plant viruses. Arab Journal of Plant Protection. 24: 135-138.
- MIGLINO, R., K.L. DRUFFEL, A.R. VAN SCHADEWIJK, and H.R. PAPPU. 2011. Molecular characterization of *Allium Virus X*, a new potexvirus in the family Alphaflexiviridae infecting ornamental allium. Archives Virology. 156: 2113-2115. DOI 10.1007/s0075-011-1109-6. <http://link.springer.com/article/10.1007/s0075-011-1109-6>.
- NAIDU, R.A. and J.D.A. HUGHES. 2003. Methods for the detection of plant viral diseases in plant virology in sub-Saharan Africa. Proceedings of Plant Virology. Nigeria. http://old.iita.org/cms/details/virology/pdf_files/233-260.pdf. [diunduh Tgl 16 Juni 2011]. hlm. 233-260.
- NATSUAKI, K.T., K. TOMARU, S. USHIKU, Y. ICHIKAWA, Y. SUGIMURA, T. NATSUAKI, S. OKUDO, and M. TERANAKA. 1994. Characterization of two viruses isolated from patchouli in Japan. Plant Disease. 78: 1094-1097.
- NOVERIZA, R., G. SUASTIKA, S.H. HIDAYAT, and U. KARTOSUWONDO. 2012a. *Potyvirus* associated with mosaic disease on patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) plants in Indonesia. Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. 18 (1): 131-146.
- NOVERIZA, R., G. SUASTIKA, S.H. HIDAYAT, dan U. KARTOSUWONDO. 2012b. Pengaruh infeksi virus mosaik terhadap produksi dan kadar minyak tiga varietas nilam. Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. 23(1): 93-101.
- SANTZ, N.T., T.H. CHEN, P.Y. LAI. 2001. A newly discovered mosaic disease of bush basil (*Ocimum basilicum*) in Taiwan. Plant Pathology Bulletin. 10 : 155-164.
- SINGH, M.K., V. CHANDEL, V. HALLAN, R. RAM, and A.A. ZAIDI. 2009. Occurrence of *Peanut stripe virus* on patchouli and raising of virus-free patchouli plants by meristem tip culture. Journal of Plant Disease and Protection. 116(1): 2-6.

- SUGIMURA, Y., B.F. PADAYHAG, M.S. CENIZA, N. KAMATA, S. EGUCHI, T. NATSUAKI, and S. OUDA. 1995. Essential oil production increased by using virus-free patchouli plants derived from meristem-tip culture. *Plant Pathology*. 44: 510-515.
- SUKAMTO, I.B. RAHARDJO, and Y. SULYO. 2007. Detection of *Potyvirus* on patchouli plant (*Pogostemon cablin* BENTH) from Indonesia. *Proceeding of International Seminar on Essential Oil*. Jakarta. hlm. 72-77.
- SUMARDIYONO, Y.B., S. SULANDARI, dan S. HARTONO. 1996. Penyakit mosaik kuning pada nilam (*Pogostemon cablin*). *Risalah Kongres Nasional XII dan Seminar Ilmiah*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia. Yogyakarta, 6-8 September 1993. hlm 912-916.
- WANG, R.L., L.W. DING, Q.Y. SUN, J. LI, Z.F. XU, and S.L. PENG. 2008. Genome sequence and characterization of a new virus infecting *Micania micrantha* H.B.K. *Archives Virology*. 153: 1765-1770.
- YI-JUN, Q., Z. XUE-PING, T. XIAO-RONG, and L. DE-BAO. 2000. Characterization and RNA2 nucleotide sequence of *Broad bean wilt virus 2* isolates P158. *Journal of Zhejiang University (Science)*. 1(4): 437-441.